به نام خدا

Invitro antibacterial activity to antibiotics

pr. Rastegar Lari

July 2008

❖انتخاب آنتی بیوتیک

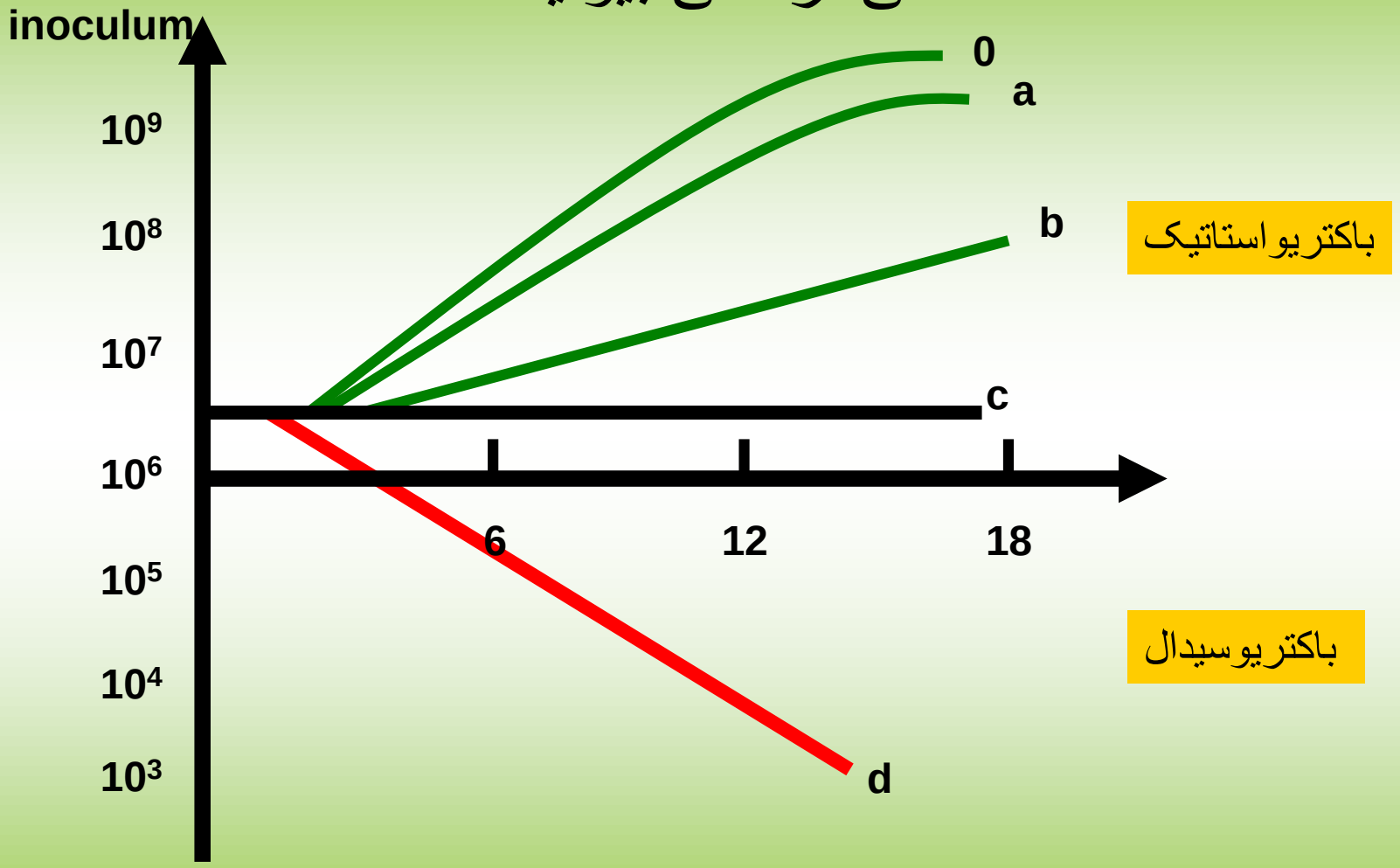
برای درمان: - فارموکوکنتیک
- شرایط بیمار

برای تست آزمایشگاهی :
- نوع باکتری
- شرایط عفونت

❖چگونگی اثر آنتی بیوتیک ها:
الف) باکتریواستاتیک (Bacteriostatic)
ب) باکتریوسیدال (Bacteriocidal)

رسیدن آنتی بیوتیک به هدف مولکولی

نمودار ۱: منحنی رشد باکتری در حضور غلظت های مختلفی از آنتی بیوتیک

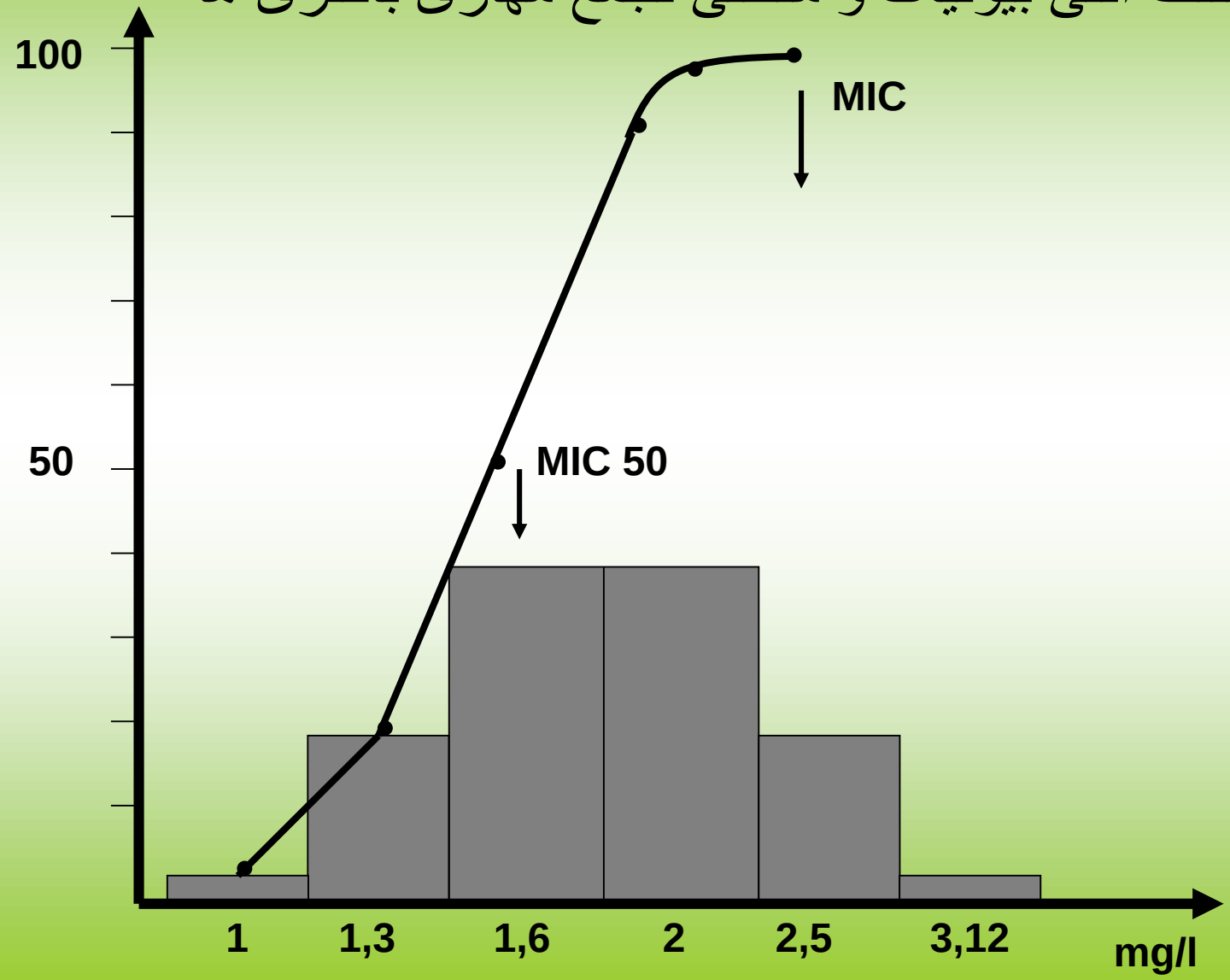


0<a<b<c<d

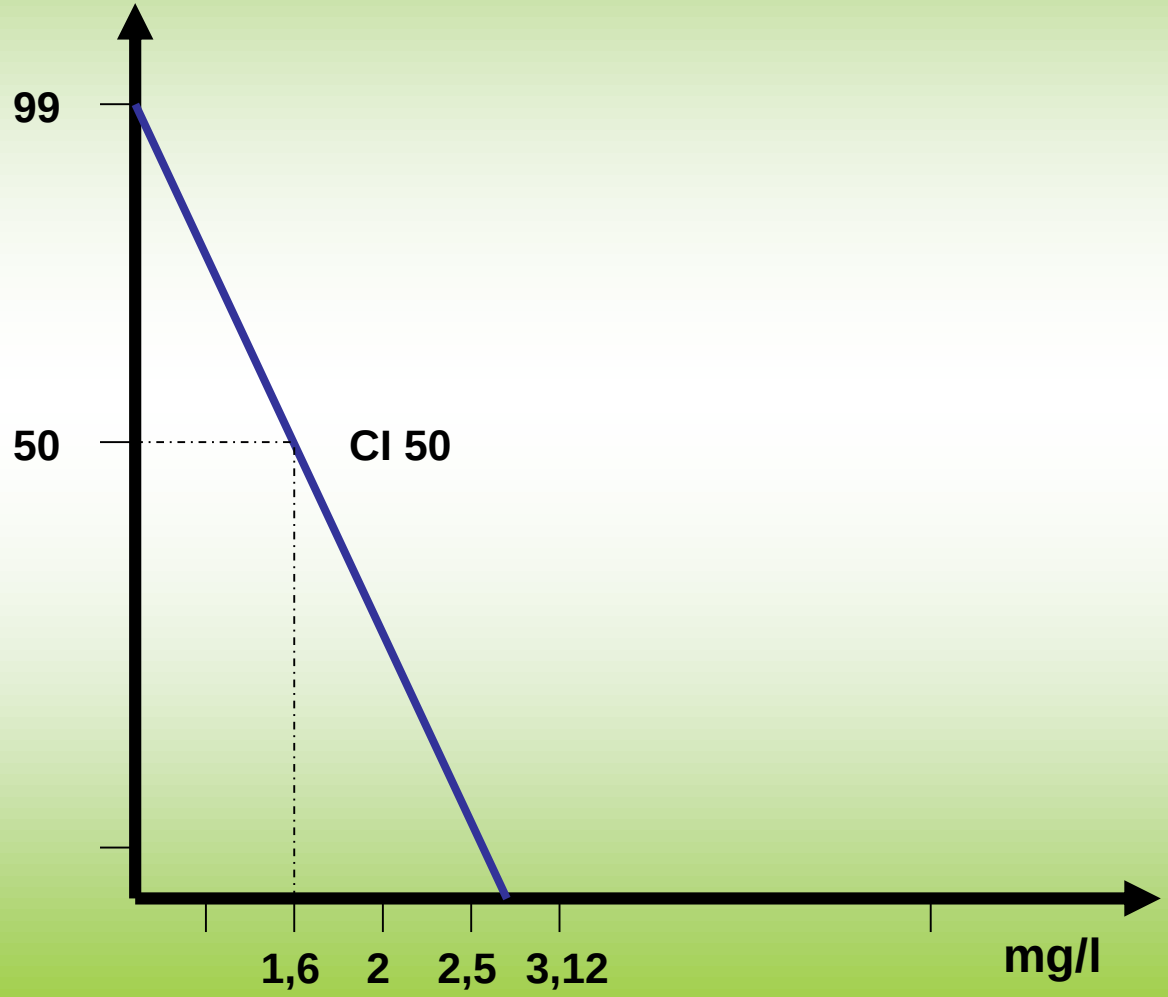
تابلو ۱: رشد باکتری در حضور غلظت های مختلفی از یک آنتی بیوتیک

غلظت آنتی بیوتیک	0	1	1.3	1.6	2.0	2.5	3.12
تعداد باکتری ها در هر غلظت	300	297	252	150	48	4	0
تعداد (%) باکتریها مهار شده در هر غلظت (تجمعی)	0 (0%)	3 (1%)	48 (16%)	150 (50%)	252 (84%)	296 (98.7%)	300 (100%)
تعداد (%) باکتریهای مهار شده در هر	0 (0%)	3 (1%)	45 (15%)	102 (34%)	102 (34%)	44 (14.7%)	4 (1.3%)

نمودار ۲: هیستوگرام درصد باکتری مهار شده در غلظت های مختلف آنتی بیوتیک و منحنی تجمع مهاری باکتری ها



نمودار ۳: منحنی مهار باکتری در غلظت های مختلف آنتی بیوتیک بصورت تجمعی



تعریف brique point (نقاط بحرانی)

MIC (Minimum Inhibitor Concentration)

ضعیف ترین غلظت آنتی بیوتیک که مانع رشد باکتری پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه با چشم غیرمسلح می باشد و غلظت های آنتی بیوتیک در این حالت ضریبی از ۲ خواهد بود.

(MIC 50): برابر است با غلظتی از آنتی بیوتیک که مانع رشد ۵۰ درصد از باکتری ها گردد (نمودار ۴-۱۲)

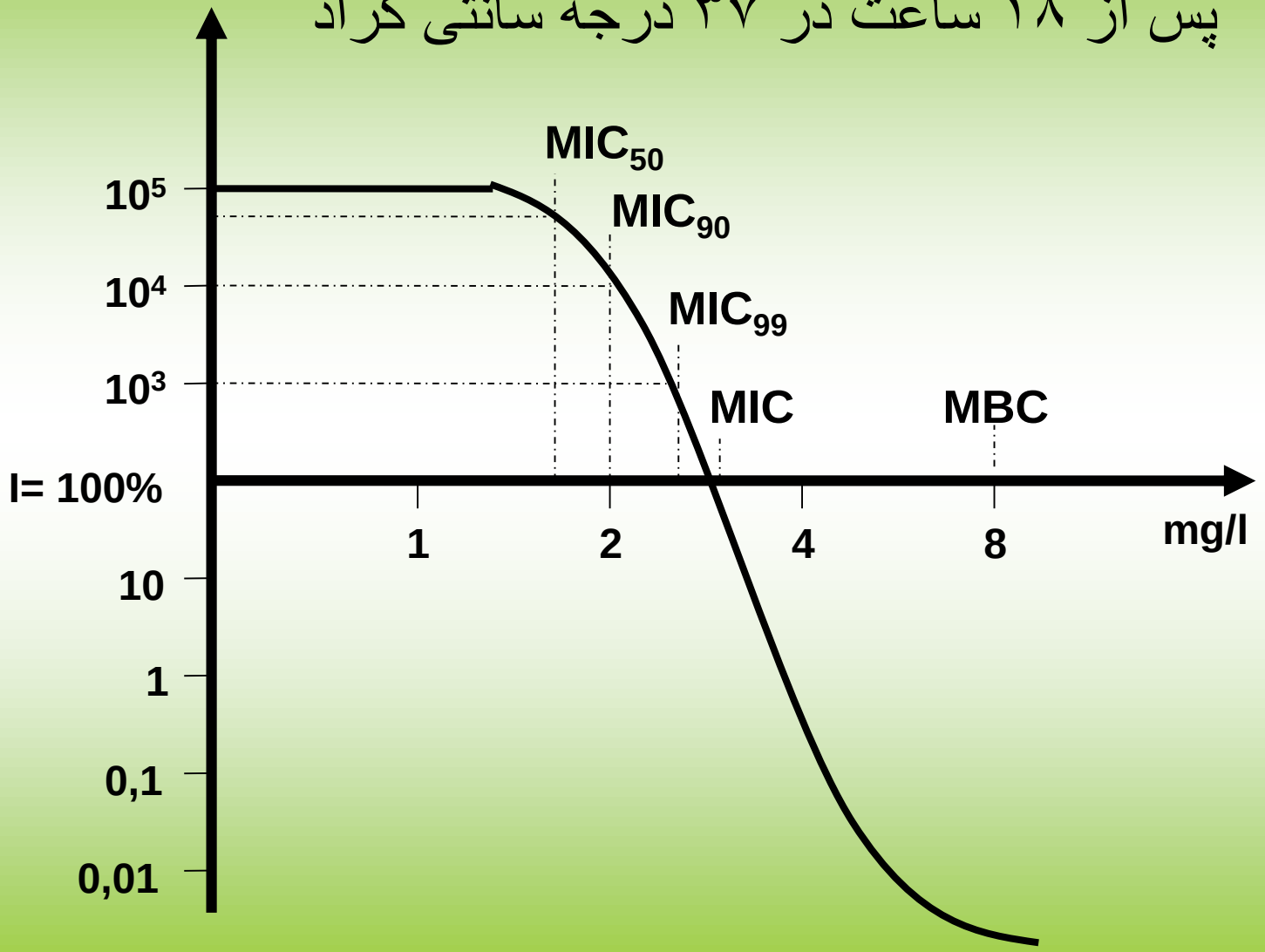
دقیق ترین و با ارزش ترین غلظت است.

حساسیت جمعیت متوسط تحت تاثیر inoclume قرار نمی گیرد و افزایش inoclume باعث افزایش هتروژنسیته باکتری می گردد.

MIC 90 برابر است با غلظتی از آنتی بیوتیک که مانع رشد ۹۰ درصد باکتری می شود که با CMA برابر است

MIC 99 برابر است با غلظتی از آنتی بیوتیک که مانع رشد ۹۹ درصد باکتری می شود

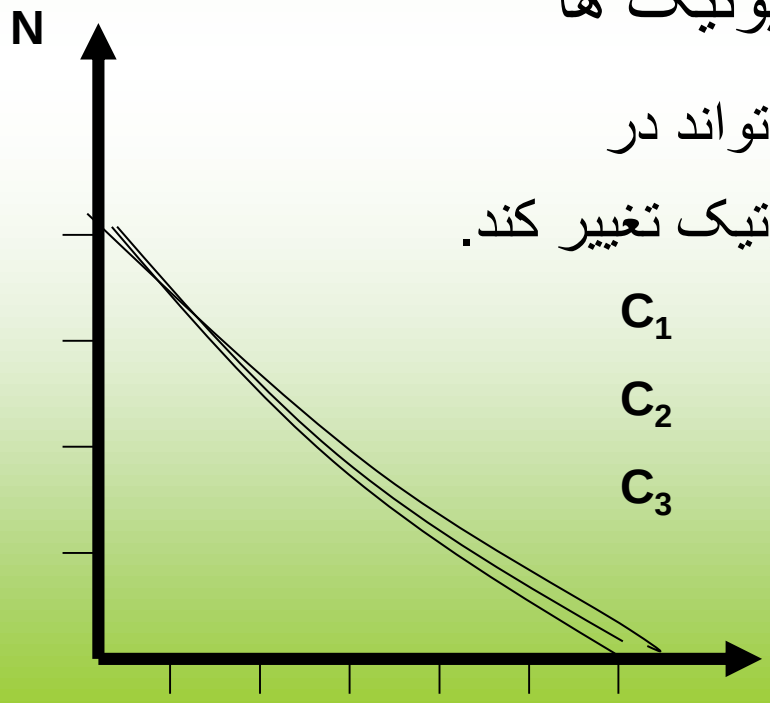
نمودار ۴: تعداد باکتری های زنده در غلظت های مختلف آنتی بیوتیک پس از ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد



باکتریساید Bactericide

زنده ماندن باکتری ها در پدیده باکتریوساید تصادفی است.
تفاوت ژنتیکی بین آنها وجود ندارد.

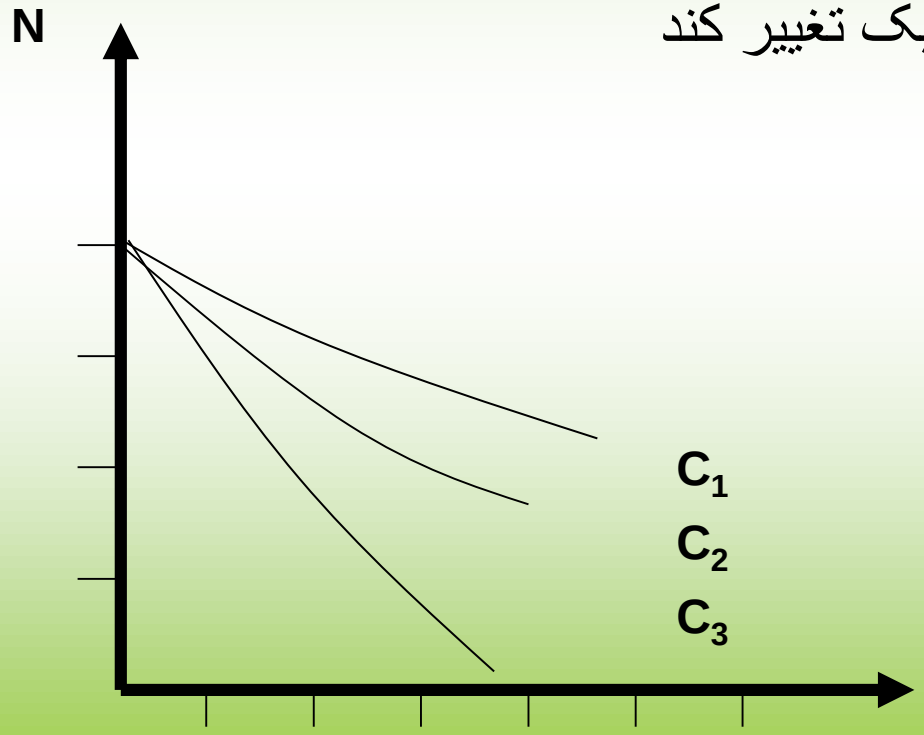
شکل ۵-۱۲سینتیک باکتریوسایدی آنتی بیوتیک ها



(Temps- dipendant) : باکتریوساید می تواند در
امتداد زمان ثابت مانده حتی اگر غلظت آنتی بیوتیک تغییر کند.
مثال: بتالاکتام ها

(dose-dependant): منحنی باکتریوسایدی می تواند در امتداد زمان با توجه به غلظت های مختلف آنتی بیوتیک تغییر کند

مثال: آمینوگلوکزیدها



MBC Point Limite

دقت آن بستگی به:

- ✓ شرایط کشت باکتری
- ✓ فاز رشد باکتری
- ✓ مقدار باکتری
- ✓ متد مورد استفاده (ماکرودلیسیون یا میکرودلیسیون)
- ✓ مقدار کمی برداشت جهت شمارش باکتری

فاکتورهای موثر در فعالیت های ضدباکتریایی آنتی بیوتیک

ارزش MBC و MIC یک آنتی بیوتیک می تواند توسط پارامترهای مختلفی تحت تاثیر قرار گیرد:

۱) Inoculum
۲) زمان، درجه حرارت، شرایط کشت
۳) طبیعت محیط کشت (مواد سازنده محیط، یون، PH و...)

تکرار نتایج یکسان مستلزم استاندارد کردن روش می باشد.

Inoculum

افزایش تعداد باکتری

MIC متفاوت

هتروژنسیته

باکتریهای تولید کننده آنزیم

محیط کشت

PH اسیدی : بتالاکتام ها و تتراسیکلین ها

قلیایی: آمینوگلوکزیدها و ماکرولیدها

کاهش Ca++ و Mg++ باعث کاهش فیکسه شدن آمینوگلوکزیدها بر روی غشاء سیتوپلاسمی و کاهش غلظت آنتی بیوتیک داخل سیتوپلاسم می گردد.

برعکس افزایش Ca++ و Mg++ باعث کاهش MIC باکتری در برابر آمینوگلوکزیدها می شود و به غلط باکتری حساس گزارش می شود.

باید Ca++: ۵۰-۱۰۰ mg/L و
Mg++: ۲۵ mg/L باشد

- وجود NaCl در محیط هنگام مصرف توام دو آنتی بیوتیک یعنی بتـالاکتام و آمینـوگلوکزید باعـث مهار آمینوگلوکزید می گردد
- افزایش Co2 باعث کاهش PH محیط می شود.

متد آنتی بیوگرام

- انتشار آنتی بیوتیک بصورت گرادیان
- رقابت بین رشد باکتری و انتشار آنتی بیوتیک از منبع
- ۳ تا ۴ ساعت زمان لازم برای انتشار آنتی بیوتیک در آگار

فرمول کپر (cooper):

$X^2= 4*D*T_0*Ln(m_0/m´)$

$T_0= L+G*log2\ (N/N_0)$

L= زمان انتظار G: زمان تقسیم

پارامترهایی که بر ایجاد zone مهاری تاثیر دارد.

پارامترهایی که می تواند زمان انتظار (L) و زمان تقسیم (G) تغییر را دهد شامل:

- غلظت باکتری N_0
- ترکیبات محیط
- درجه حرارت

بدست آمدن نتایج مشابه مجدد مستلزم شرایط یکسان خواهد بود.

برای همان آنتی بیوتیک با سوش های مختلف با زمان انتظار متفاوت و زمان تقسیم مختلف اما دارای حساسیت یکسان می تواند منطقه مهاری کاملا متفاوت را ایجاد کند.

انتخاب شارژ دیسک:

دو برابر شدن غلظت آنتی بیوتیک تنها ۱ تا ۳ میلی متر قطر را افزایش می دهد.

حداقل غلظت مهاری باید ۱۰mm باشد.

منحنی ۸-۱۲ ارتباط بین zone مهاری و مدت زمان انتشار آنتی بیوتیک

شرایط تکنیکی

محیط کشت Muler-Hinton

آنتی بیوگرام:

قطر ۴mm

PH 7.4

غلظت تیمیدین ۵۰mg/ml

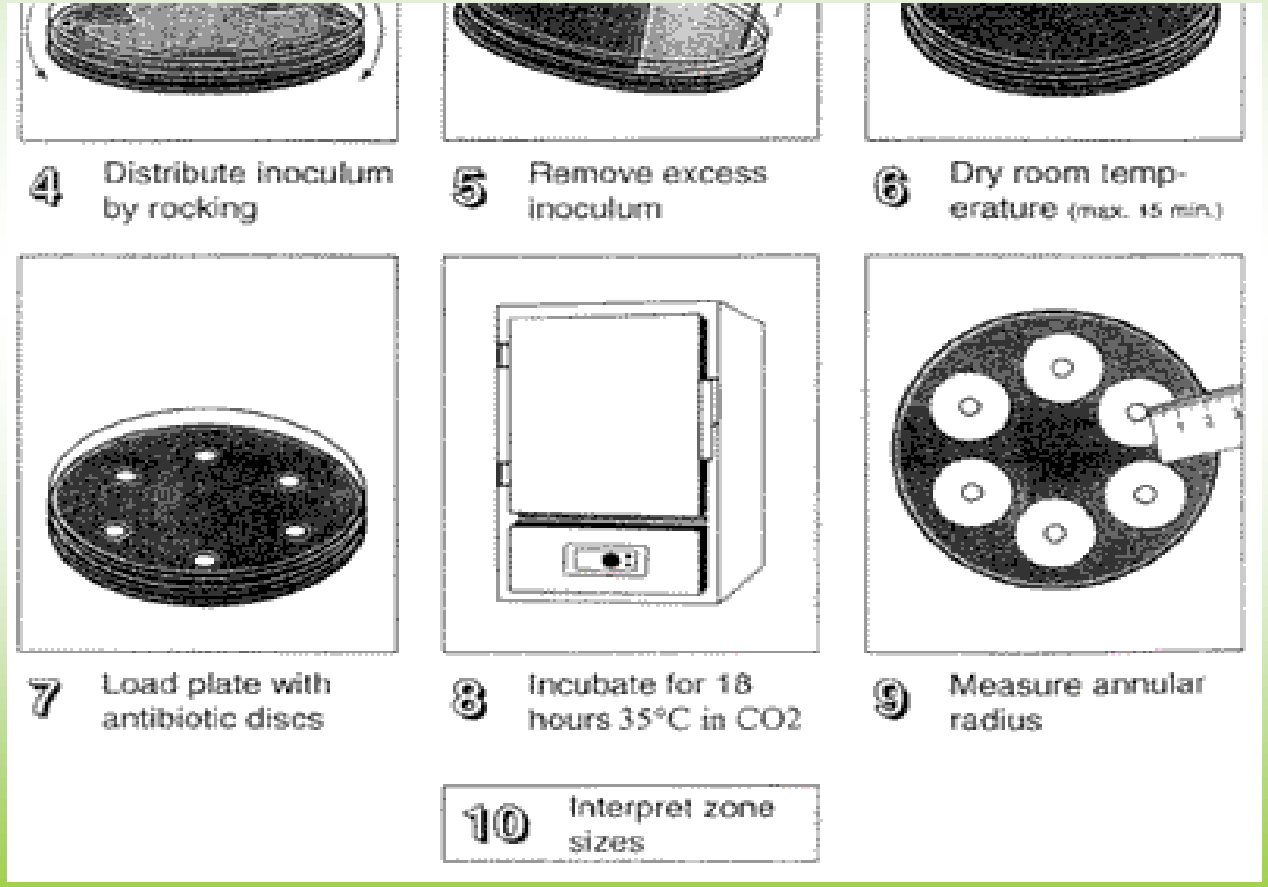
Inoclum 2-3*10^6 ml

متد غرق شدن

آنتی بیوگرام اتوماتیزه:

سیستم دو غلظتی (ABAC, API, ATB)

سیستم سریع



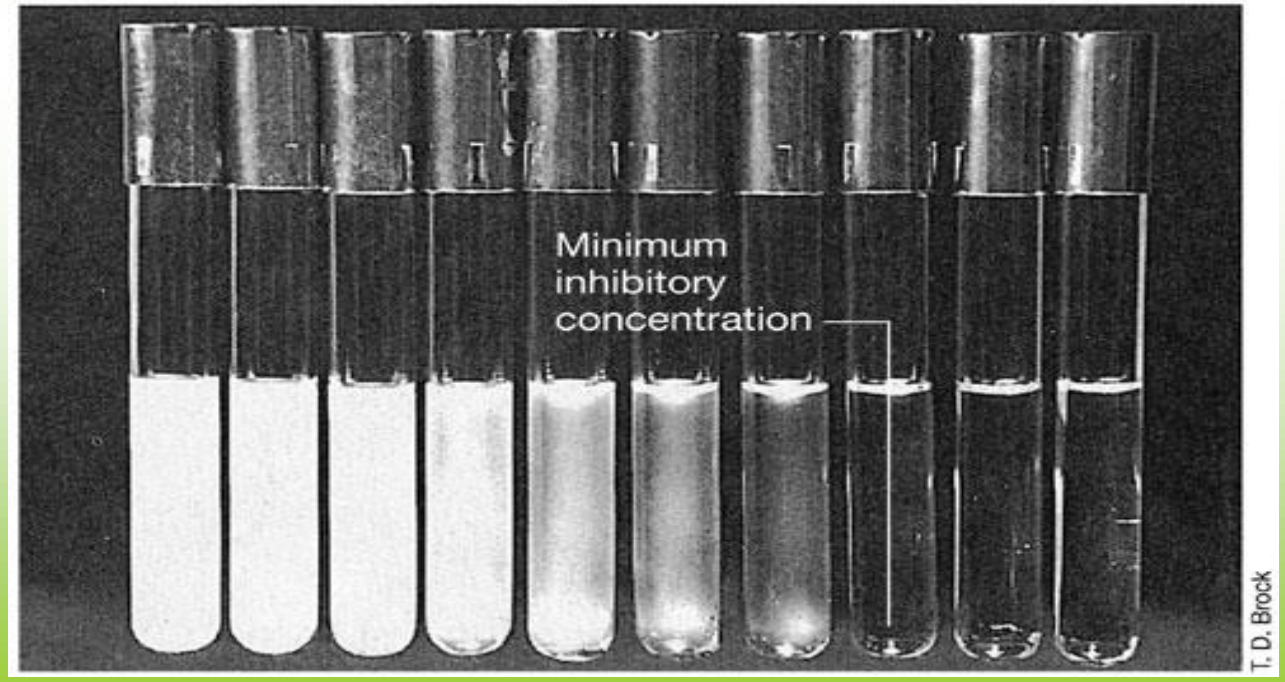
MIC:

متد رقیق کردن در محیط آگار

$۱۰^{۴}$ باکتری

MIC= ۰ تا ۳ کلنی

رقیق کردن در محیط مایع



کنترل کیفی:

با استفاده از سوش های ATCC

تفسیر نتایج:

- طبقه بندی کلینیکی

تعیین کمی و کیفی آنتی بیوتیک تقریبا مشابه است

ارزش S-I-R مستلزم شرایط خاص است

۱- غلظت آنتی بیوتیک سرم و بافتی

۲- انتشار MIC

۳- نتایج کلینیکی مستند

شناخت و انتخاب حساسیت کلینیکی:

شامل دو شرط می باشد

- فارماکولوژی
- تعیین S-I-R با توجه به غلظت آنتی بیوتیک Invivo

طبقه بندی کلینیکی:

S-I-R

باکتری حساس (S)

باکتری مقاوم(R)

باکتری های واسط (I)

Tolerance:

فقدان یا مهار سیستم اتولپتیک

حدود آنتی بیوگرام:

تفسیر نتایج باید با شناخت مکانیزم مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک همراه باشد.

آنتی بیوتیک ها و انتخاب تست آنتی بیوگرام و سوشهای مختلف

مصرف توام دو آنتی بیوتیک

پایان